

MICROREACTOR CHIP, METHOD FOR TESTING CHEMICAL REACTION, AND THIN FILM MATERIAL FOR MICROREACTOR CHIP

Patent Number: JP2002027984

Publication date: 2002-01-29

Inventor(s): SAITO YASUYO

Applicant(s): MITSUBISHI CHEMICALS CORP

Requested Patent: ☐ JP2002027984

Application Number: JP20000215328 20000717

Priority Number(s):

IPC Classification: C12N15/09; C12M1/00; C12Q1/68; G01N31/22; G01N33/53; G01N33/566; G01N35/02; G01N37/00

EC Classification:

Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To simplify production work to enhance the productivity, and to enhance the production accuracy for a microreactor chip, for a method for testing a chemical reaction, and for a thin film material for the microreactor chip.

SOLUTION: This microreactor chip has a chip substrate 1 and a thin film material 2 laminated on the chip substrate 1, wherein the thin film material 2 has an opening 3 for containing a specimen in cooperation with the chip substrate 1 in the laminated state of the thin film material 2 on the chip substrate 1.

Data supplied from the esp@cenet database - I2**BEST AVAILABLE COPY**

(11)特許出願公開番号
特開2002-27984
(P2002-27984A)

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 チップ基板と、
該チップ基板に積層される薄膜部材とをそなえ、
該薄膜部材の該チップ基板への積層状態において該チップ基板と協働して試料を収容するための開孔部が該薄膜部材に設けられていることを特徴とする、マイクロリアクタチップ。

【請求項2】 該薄膜部材の厚さが $3\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ の範囲であることを特徴とする、請求項1記載のマイクロリアクタチップ。

【請求項3】 上記の薄膜部材に設けられた開孔部が、独立した複数の微小孔で構成されていることを特徴とする、請求項1又は2記載のマイクロリアクタチップ。

【請求項4】 該微小孔の開孔寸法が $10\mu\text{m}\sim 500\mu\text{m}$ の範囲であることを特徴とする、請求項2記載のマイクロリアクタチップ。

【請求項5】 上記の薄膜部材に設けられた開孔部が、該試料を流通させるための流路として形成されていることを特徴とする、請求項1又は2記載のマイクロリアクタチップ。

【請求項6】 該流路の幅寸法が $10\mu\text{m}\sim 1000\mu\text{m}$ の範囲であることを特徴とする、請求項5記載のマイクロリアクタチップ。

【請求項7】 該試料が、オリゴヌクレオチド又はペプチドであることを特徴とする、請求項1～6の何れかの項に記載のマイクロリアクタチップ。

【請求項8】 請求項1～7の何れかの項に記載のマイクロリアクタチップを用いて化学反応試験を行なうことを特徴とする、化学反応試験方法。

【請求項9】 試料を収容するのに使用される開孔部が設けられ、分割されてチップ基板に積層されることを特徴とする、マイクロリアクタチップ用薄膜部材。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、微量の試料により所定の化学反応を行なわせるための、マイクロリアクタチップ、化学反応試験方法及びマイクロリアクタチップ用薄膜部材に関する。

【0002】

【従来の技術】従来より、生体試料を検出したり、化学合成を行なうためのチップ（マイクロリアクタチップ）が種々開発されている。以下、このような生体試料検出用のチップ及び化学合成用のチップにおける各従来技術についてそれぞれ説明する。先ず、生体試料検出用のチップについて説明すると、生体試料検出用のチップとしては、例えば、ハイブリダイゼーション法を利用してDNA（デオキシリボヌクレオチド）の塩基配列を解析するのに用いられるチップ（DNAチップ）や、抗原-抗体反応や酵素反応を利用した診断チップ等がある。

【0003】DNAは4種類の塩基から構成され、これ

らの塩基はそれぞれ結合する塩基が決まっており、ハイブリダイゼーション法では、この原理を利用して、かかる塩基配列の解析が行なわれる。つまり、検査対象となる塩基の配列が未知のDNAを、比較対象となる塩基の配列が既知の複数種類のDNAと混合し、検査対象のDNAと比較対象のDNAとが結合しているか否かを調査することで、検査対象のDNAと結合しうるDNAを特定する。これにより、この特定されたDNAの塩基配列と相補的な配列が、検査対象のDNAの塩基配列、或いは、検査対象のDNAの塩基配列の一部であると判定することができるのである。

【0004】具体的には、複数種類の比較対象となるDNA（プローブDNA）を含む溶液（以下、プローブ溶液とも言う）を、スライドガラス上にドット状に付着させ（これをスポッティングと言う）固定する。このプローブDNAを付着させたスライドガラス（＝DNAチップ）に、検査対象となるDNAを含む溶液を滴下した後、DNAの結合反応が起こり得る所定の条件下において、ハイブリダイズさせる。DNAチップはその後洗浄され、プローブDNAと結合しなかったDNA溶液が洗い流される。未知の検査対象となるDNAは予め蛍光標識されているため、この検査対象のDNAと比較対象となるプローブDNAとが結合している部分のみが蛍光標識された状態になる。

【0005】したがって、その後DNAチップをレーザー光でスキャンしてスライドガラス上の各位置における蛍光量を測定することにより、各プローブDNAについて検査対象のDNAと結合したか否かを速やかに判定することができ、この判定結果に基づいて検査対象のDNAの塩基配列を解析することができるのである。そして、このようなハイブリダイゼーション法に用いられるDNAチップは、所定の大きさ（例えば $25\text{mm}\times 75\text{mm}$ ）のチップ基板（例えばスライドガラス）上に、多数（数十個から数万個）のプローブDNAをスポッティングすることにより作成される。

【0006】ハイブリダイゼーション法を効率的に行なうためには、スポット密度（単位面積当たりにスポッティングされるプローブDNAの数）を増加し、チップ基板（DNAチップ）上のプローブDNAを増加する必要がある。市販されている一般的なDNAチップでは、チップ基板の表面に単一のシリカコートが施されており、このシリカコートの表面張力で液滴の広がり具合を調節することで基板上のスポット数を増加させている。

【0007】しかし、上述したようにチップ基板の表面に単一のコーティング処理を施すだけでは、プローブDNAが周囲に広がることを十分に規制できず、1スポット当たりのプローブDNAの大きさ（以下、スポット面積という）が比較的大きなものになってしまう。このため、隣り合うプローブDNAの距離を狭めてスポット密度を増加させるのには限界があり、解析作業の高効率化

10

20

30

40

50

を図るべく、さらなるスポット密度の増加が要求されている。

【0008】スポット密度を増加させる手法としては、ガラス等のチップ基板の表面に、感光性樹脂を用いてブローブDNAを収容するための枠体を形成することが知られている。ブローブDNAを枠体内に収容させることによりスポット面積を規制することができるので、隣り合うブローブDNAの距離を狭めることができ、スポット密度を増加させることができる。

【0009】このようなチップ基板上に枠体を形成する技術としては、特開平11-187900号公報に、マトリクス状に配置された凹部を形成した枠体構造を有するマトリクスパターンを、固層上（チップ基板）に形成する技術が開示されており、マトリクスパターンを形成する手法として、チップ基板表面にコートした樹脂上にフォトレジストをコートしバターンニングの後に樹脂をエッチング等の工程によりバターンニングする方法や、チップ基板表面に感光性の樹脂をコートし、この感光性樹脂そのものをフォトマスクを用いたフォトリソグラフィーのプロセスにより露光、現像を行ない、必要であればさらに硬化させて、バターンニングする方法が例示されている。

【0010】さて、次に化学合成用のマイクロリアクタチップについて説明する。化学合成では、試験管やビーカー等の容器に所定の試料を収容し、この容器内で試料を混合させて所定の合成反応を行なわせる方法が通常行なわれているが、近年では、反応の効率化のためにマイクロリアクタチップを用いて化学合成を行なう研究がなされている。

【0011】このような化学合成用マイクロリアクタチップの一例としては、チップ基板上に、複数種類の試料を流すための複数のマイクロ流路がチップ基板上にそれぞれ形成され、これらのマイクロ流路はチップ基板上で合流するように形成されているものがある。この場合、複数種類の試料を、マイクロ流路にそれぞれ微量量流すだけで合流後の流路において所定の合成反応が行なわれるとともに、これらの試料が流路を流れながら合成反応が進行するので、このような合成反応の進行を観察することが可能となっている。

【0012】このような化学合成用のマイクロリアクタチップは、微量な試料（反応液）で合成反応を行なわせることができるので合成反応を効率的に行なえ、特に、生化学反応のように試料が微量しか入手できない場合、有効である。また、合成ロボット等を用いたスクリーニングのように同種の反応を多量にこなすことも可能であり、効率的である。さらには、激しい発熱反応を伴う合成反応でも安全に行なえる点や、取り扱いが容易な点から近年特に注目されている。

【0013】このようなマイクロリアクタチップとしては、例えば、特開平10-337173号公報に、シリ

コン基板（チップ基板）の表面に複数の独立した反応チャンバを形成したものが開示されている。反応チャンバは、複数の注入ポート、排出ポート及びこれらの注入ポート、排出ポートを連通させるチャンネルから構成され、異方性エッチングによりシリコン基板（チップ基板）の表面に形成される。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、上述した従来技術では、DNAチップについては、チップ基板の表面に枠体構造を形成するのにフォトレジストやフォトリソグラフィーの技術を用いており、これを行なうためには、チップ基板の表面に樹脂をコートしたり、さらにこのコートした樹脂にバターンニングやエッチングを行なう必要があり、製造に非常に手間が掛かってしまうという課題がある。

【0015】また、同様に、化学合成用チップについても、シリコン基板（チップ基板）の表面に異方性エッチングによりマイクロ流路を形成するので製造に非常に手間が掛かってしまうという課題がある。さらに、チップ基板の表面にマイクロ流路を設けることは、即ちチップ基板に溝を形成することであるが、このような溝加工は比較的加工精度が低いという課題がある。つまり、溝加工においては、チップ基板の材質や加工条件に応じて、溝の深さやエッジ形状に微妙な差異が生じる虞があるのである。

【0016】本発明は、このような課題に鑑み創案されたもので、製造作業を簡便化して生産性を向上させることができるとともに、製造精度を向上させることができるようにした、マイクロリアクタチップ、化学反応試験方法及びマイクロリアクタチップ用薄膜部材を提供することを目的とする。

【0017】

【課題を解決するための手段】このため、請求項1記載の本発明のマイクロリアクタチップは、チップ基板と、該チップ基板に積層される薄膜部材とをそなえ、該薄膜部材の該チップ基板への積層状態において該チップ基板と協働して試料を収容するための開孔部が該薄膜部材に設けられていることを特徴としている。

【0018】この場合、該薄膜部材の厚さが $3\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ の範囲であることが好ましい（請求項2）。また、上記の薄膜部材に設けられた開孔部を、独立した複数の微小孔で構成しても良い（請求項3）。この場合、該微小孔の開孔寸法が $10\mu\text{m}$ ～ $500\mu\text{m}$ の範囲であることが好ましい（請求項4）。

【0019】或いは、上記の薄膜部材に設けられた開孔部を、該試料を流通させるための流路として形成しても良い（請求項5）。この場合、該流路の幅寸法が $10\mu\text{m}$ ～ $1000\mu\text{m}$ の範囲であることが好ましい（請求項6）。また、該試料が、オリゴヌクレオチド又はペプチドであることが好ましい（請求項7）。

【0020】請求項8記載の本発明の化学反応試験方法は、請求項1～7の何れかの項に記載のマイクロリアクタチップを用いて化学反応試験を行なうことを特徴としている。請求項9記載の本発明のマイクロリアクタチップ用薄膜部材は、試料を収容するのに使用される開孔部が設けられ、分割されてチップ基板に積層されることを特徴としている。

【0021】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照して本発明の実施の形態について説明する。

(A) 第1実施形態の説明

まず、本発明の第1実施形態は、薄膜部材に設けられた開孔部が、独立した複数の微小孔で構成されているものであり、具体的には、DNAチップ（マイクロリアクタチップ）、このDNAチップを用いたハイブリダイゼーション法（化学反応試験方法）及びこのDNAチップに用いられる薄膜部材である。以下、これらについて説明する。図1～図5は本実施形態のDNAチップについて示す図である。

【0022】本発明のDNAチップは、図1(A)、(B)に示すように、チップ基板1と、このチップ基板1に積載され貼り付けられる疎水性の薄膜部材2とをそなえて構成されている。そして、薄膜部材2には、複数（例えば1,000～80,000個）の微小な孔部（開孔部）3が形成されており、この開孔部3とチップ基板1の表面とから形成される凹部3aに、生体用試料としてのDNAを含む水溶性のプローブ溶液（プローブDNA）が収容されるようになっていく。

【0023】以下、チップ基板1、薄膜部材2及び開孔部3について説明する。まず、チップ基板1について説明すると、チップ基板1の大きさは、ここでは一般に使用されるスライドガラスと同程度の大きさ（例えば25mm×75mm程度）に設定され、厚みは、DNAを検出するための装置の設定等に依存するものであるが、通常1mm前後（0.7mm～1.6mm程度）に設定されている。また、上述したように、チップ基板1の表面と薄膜部材2の開孔部3とによりプローブ溶液を収容する凹部3aが形成されており、チップ基板1のプローブ溶液を収容する側の表面には、親水処理が施工されることが好ましい。このような親水処理としては、ここでは、例えば、後述するようにプローブ溶液中のDNAを固定化するためのコーティング剤が塗工されてコーティング膜1aを形成させるような処理がなされている。

【0024】チップ基板1の材質は、ガラスでも樹脂でも良い。樹脂を使用する場合、この樹脂（基材樹脂）は、熱可塑性でも熱硬化性でも良く、ラジカル硬化性でも良い。また、ホモポリマー、コポリマー、ブロックポリマー、グラフトポリマーのいずれでも良い。光学特性に優れるもので400nm以上の波長領域にほとんど吸収を示さないものが好ましく、蛍光検出時にバックグラ

ウンドノイズが発生しないものが特に好ましい。例えば、ポリメチルメタクリレートおよびその共重合体などのアクリル酸系樹脂、ポリスチレンまたはその共重合体、MS樹脂（メタクリル酸メチルとスチレンのランダム共重合体）、ポリカーボネート、ポリアルキレンテレフタレート、脂肪族または脂環式ポリアミド、透明ポリオレフィン（ポリメチルペンテン、ポリエチレン（共）重合体、ポリプロピレン（共）重合体、など）、シクロオレフィンまたはシクロアルカン類から誘導した各種ポリマー、ポリ酢酸ビニル、ポリビニルピロリドン、AS樹脂及びSAN樹脂（アクリロニトリルとスチレンの共重合体）、ABS樹脂（アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン樹脂）、ポリ塩化ビニル、ポリビニルフルオリド、ポリビニリデンフルオリド、ポリアリレート、ポリサルホン、ポリエーテルサルホンなどの透明性を有する熱可塑性樹脂、トリアセチルセルロースまたはその部分ケン化物、ラジカル重合性または熱重合性を有する官能基を有する化合物から誘導した各種樹脂硬化物（レンズ、光ディスク、光学透明部品等に使用される種々の硬化物）、透明性を有する各種ゴムやエラストマー類、などを例示することができるが、これらに限定されるものではない。

【0025】このうち、ポリメチルメタクリレートおよびその共重合体のようなアクリル酸系樹脂、MS樹脂などのスチレン系樹脂、ポリカーボネート、透明性ポリオレフィン（ポリエチレン系、ポリプロピレン系）、脂環オレフィンやシクロアルカン誘導体から誘導された透明性を有する各種樹脂などの熱可塑性樹脂が好ましい。このような樹脂を用いる場合、チップ基板1は、各樹脂の特性に合わせ通常行なう成形方法により成形される。例えば射出成形、押出成形、圧縮成形、射出圧縮成形、トランスファー成形、カレンダー成形、またキャスト成形などの注型による成形を例示することができるがこれに限定されるものではない。

【0026】さて、上述したようにチップ基板1のプローブ溶液を収容する側の表面には、プローブ溶液中のDNAを固定化するためのコーティング剤が塗工されているのが好ましく、このようなコーティング剤としては、

(1) DNAをイオン結合で固定化するのに適した、正電荷を表面官能基として保有するコーティング剤、
(2) DNAを水素結合で固定化するのに適した表面官能基を保有するコーティング剤、または(3)（修飾、オリゴ）DNA末端アミノ基を共有結合で固定化するのに適した官能基を表面官能基として保有するコーティング剤が好ましい。

【0027】(1)の官能基としては、代表的なものとしては、四級アミノ基（アンモニウム基）、ホスホニウム基、スルホニウム基、ピグアニド基、ペタイン基（代表的には四級アミノ基とCOO⁻基を含む両性イオン基）等が挙げられるが、中では四級アミノ基が特に好ま

しい。(2)の官能基としては、代表的なものとしては、ウレタン基、ウレア基、ヒドラジド基、アミド基、アミノ基、ヒドロキシ基、カルボン酸基、スルホン酸基、リン酸基等が挙げられるが、導入の容易さ、コーティングの耐久性、効果等を考えると、ウレタン基、ヒドロキシ基等が特に好ましい。

【0028】(3)の官能基としては、代表的なものとしては、ケトン基、アルデヒド基のようなアミノ基とシッフ塩基を形成するカルボニル基、アミノ基と付加反応する基であるエポキシ基、アズラクトン基又はエビスルフィド基など、アミノ基とマイケル付加等の付加反応をして共有結合を形成するアクリロイル基、メタクリロイル基、アクリルアミド基、メタクリルアミド基又はマレイミド基等が挙げられるが、導入の容易さを考えると、カルボニル基、エポキシ基、アクリロイル基及びメタクリロイル基が特に好ましい。

【0029】このようなコーティング剤の塗工方法は、代表的には、基材に、ディップコート法、スピンコート法、フローコート法、スプレーコート法、バーコート法、及びグラビアコート、ロールコート、ブレードコート、及びエアナイフコート、などの塗工器具により塗工する方法で、溶剤乾燥(及び必要に応じ活性エネルギー線照射)し、基材表面に0.1 μm ~50 μm 、好ましくは0.2 μm ~5 μm の平滑なコーティング膜が得られるよう塗工する。

【0030】活性エネルギー線硬化が必要な場合には、塗布したコーティング組成物層を架橋硬化せしめるため、キセノンランプ、低圧水銀灯、高圧水銀灯、超高圧水銀灯、メタルハライドランプ、カーボンアーク灯、タングステンランプなどの光源から発せられる紫外線、あるいは通常20~2000kVの電子線加速器から取り出される電子線、 α 線、 β 線、 γ 線などの活性エネルギー線を照射し、硬化させてコーティング膜を形成させる。

【0031】次に、薄膜部材2及び開孔部3について説明する。薄膜部材2は樹脂製で疎水性を有する。使用される樹脂としては、熱可塑性のものでも熱硬化性のものでも良いが、特に、ポリエチレン、ポリプロピレン等のポリオレフィン系樹脂、ポリメチルメタクリレート等のアクリル酸系樹脂、ポリスチレン系樹脂、ポリカーボネート系樹脂のような熱可塑性樹脂が好ましい。これらは、ホモポリマー、コポリマー、ブロックポリマー、グラフトポリマーでも良い。

【0032】また、薄膜部材2の厚みT1は、3 μm ~500 μm の範囲で設定される。薄膜部材2の厚みT1は、即ち、薄膜部材2の開孔部3とチップ基板1とにより形成される試料(ブローブ溶液)を収容するための凹部3aの深さであり、かかる深さを上記の範囲内で設定することにより、試料を安定して収容でき、且つ、収容される試料の量を必要最小限にできる。

【0033】なお、樹脂の成型方法としては、チップ基板1の材料として樹脂を用いた場合に適用される成型方法と同様である。開孔部3は、所定厚みに成型後の薄膜部材2にレーザ加工又は打ち抜き加工により貫設されて形成される。ここでは、各開孔部3は真円状に形成されており、直径(開孔寸法)D1は、10 μm 以上であれば特に限定されないが、10 μm ~500 μm の範囲で設定することが好ましい。これにより、開孔部3内へのスポッティングが比較的容易になり、また、チップ基板1上のブローブ溶液のスポッティング数を十分に確保できる。

【0034】なお、開孔部3の形状は、真円に限定されず、例えば長円や四角形やその他の多角形であっても良いが、加工しやすさの点では真円が好ましい。また、長円であれば、長軸の長さを10 μm ~500 μm の範囲で設定することが好ましく、四角形であれば対角線を10 μm ~500 μm の範囲で設定することが好ましい。即ち、平面視における開孔部3の形状において最大となる寸法(開孔寸法)を、10 μm ~500 μm の範囲で設定することが好ましい。

【0035】また、本実施形態のようにチップ基板1の大きさ(=薄膜部材2の大きさ)が25mm×75mmであれば、上述したように薄膜部材2に1,000~80,000個の開孔部3が設けられる程度の開孔密度(即ちスポット密度)であることが好ましく、この程度のスポット密度であれば、効率的に試験を行なうことが可能である。

【0036】さらに、ブローブDNAと試料DNAの結合状態は、通常、レーザでスキャニングした後、画像処理を行なうことで解析されるが、開孔部3は、このような画像処理上の観点から均等なピッチで配列されていることが好ましい。なお、薄膜部材2は、例えば、接着剤によりチップ基板1に貼り付けられるが、接着剤により接合されるチップ基板1と薄膜部材2との接合部でブローブ溶液を収容する凹部3aの内側の部位では、接着剤とブローブ溶液とが接触する可能性もあるので、このような接着剤としては耐水性のものが使用される。また、ハイブリダイゼーションを行なう際、DNAチップの雰囲気温度はDNAの結合反応が生じやすい所定温度にまで昇温されるので、接着剤は耐熱温度が60~80℃以上のものが使用される。接着剤は、このような耐水性及び耐熱性を有するものであれば特に限定されないが、例えば、無水マレイン酸が好ましい。

【0037】ここで、本DNAチップの製造方法について図2の工程図を参照しながら説明する。まず、チップ基板1について説明すると、先ずステップA10で、ガラス又は樹脂が所定の形状(ここでは25mm×75mm程度の平板形状)に成形される。特にチップ基板1に樹脂材を用いる場合について説明すると、樹脂材は上述した各種の成型方法により所定の厚み(ここでは0.7mm~1.6mm程度)にされた後、所定の平面寸法に

裁断される。

【0038】そして、このように所定形状に成型されたチップ基板1には、ステップA20で、親水処理（例えばDNAを固定化するためのコーティング剤の塗布処理等）の表面処理が施工される。次に、薄膜部材2について説明する。薄膜部材2は、通常、ステップA30～ステップA50においては、複数の連続的に形成された状態で製造が進められ、薄膜部材2をチップ基板1に貼り付ける直前のステップA60において、1枚のチップ基板と略同じ寸法（ここでは25mm×75mm程度）に裁断される。つまり、先ずステップA30で樹脂が所定の厚み（ここでは3μm～500μm）で薄膜状に成形され、次にステップA40で片面に接着剤が塗布された後、ステップA50で所定の配置及び数量で開孔部3がレーザ加工又は打ち抜き加工により貫設される。

【0039】この時点では、上述したように、複数の薄膜部材2が連続的に形成されており、ここでは、図示しないステップで、このステップA30～A50の工程が完了した長尺の薄膜部材2'を巻回して、例えば、図3に示すようなロールを構成するようになっている。そして、ステップA60で、ロール2'から順次所定長さ分の薄膜部材が送り出され、図中に二点鎖線で示す部分で切断することにより、1枚のチップ基板1に対応する所定寸法の薄膜部材2が得られるのである。

【0040】そして、ステップA70で、チップ基板1の表面処理が施工された側に、所定寸法に裁断された薄膜部材2が貼り付けられ、さらに、ステップA80で、薄膜部材2の開孔部3とチップ基板1の表面とからなる凹部3aに、図示しないスポットティングヘッドにより配列が既知のDNAを含むブローブ溶液が滴下され、DNAチップの製造が完了する。

【0041】本発明の第1実施形態としてのDNAチップは上述したように構成されており、以下の手法（本発明の第1実施形態としての化学反応試験方法）により、図4のフローチャートに示すように検査対象となるDNAの塩基配列の解析が行なわれる。つまり、先ず、ステップB10で、互いに異なるブローブ溶液を収容するDNAチップの凹部3aに、検査対象であるDNAを含む試料溶液が滴下される。

【0042】そして、ステップB20で、DNAの結合反応が起こりやすいようにDNAチップの周囲温度が所定温度（60～80℃前後）に調整されてハイブリダイゼーションが行なわれる。この際、薄膜部材2の表面には、図1（B）中に二点鎖線で示すようにガラスやフィルム等の表面部材4が配置される。これにより、凹部3a内のDNA溶液中の水分が高温雰囲気下で蒸発しないようにするとともに、DNAチップに滴下された検査対象のDNA溶液が、DNAチップの表面全体に渡って凹部3a内に固定された全てのブローブ溶液と確実に接触させるようにしている。

【0043】この場合、薄膜部材2の表面にさらに接着剤層を設けていると、表面部材4との密着が簡便にできる。なお、このように表面部材4を薄膜部材2に貼り付ける代わりに、例えば、DNAチップをフィルム材により構成される袋状物に収容後、この袋状物を封止するとともに内部を真空引きして、DNAチップをこの袋状物により密閉して、凹部3a内の試料と周囲とを遮断するようにしても良い。

【0044】未知の検査対象となるDNAは予め蛍光標識されているため、ステップB30で薄膜部材2の上面の表面部材4が外されてDNAチップが洗浄された後には、この検査対象のDNAと比較対象となるブローブ溶液中のDNAとが結合した部分のみが蛍光標識された状態となり、各凹部3a内の試料の蛍光量を測定することにより、どの凹部3aのブローブ溶液が検査対象のDNAと結合したかが検出される。

【0045】つまり、ブローブ溶液は、チップ基板1の表面に形成されたコーティング膜1aに固定されており、この固定されたブローブ溶液と検査対象のDNAとが結合すれば、この検査対象のDNAに施された蛍光標識がコーティング膜1aに固定されることとなる。したがって、DNAチップを洗浄すると、ブローブ溶液と結合しなかった検査対象のDNAは洗い流されるが、ブローブ溶液と結合した検査対象のDNAは、蛍光標識とともにコーティング膜1aに固定されることとなり、各凹部3a内の試料の蛍光量を測定することにより、どの凹部3aのブローブ溶液が検査対象のDNAと結合したかを検出でき、これに基づき検査対象のDNAの塩基配列が解析されるのである。

【0046】そして、このようなDNAの塩基配列を解析することにより遺伝子解析や、ひいては遺伝子病等の診断が行なわれる。したがって、本DNAチップ及び本DNAチップを用いた化学反応試験では、以下のような利点が得られる。つまり、ブローブ溶液は凹部3aに収容されるので、隣り合うブローブ溶液の混合を防止でき、凹部3aの相互間距離を狭めてスポット密度を十分に高いものとすることができるという利点がある。

【0047】また、DNAチップは、多数の開孔部3が設けられた薄膜部材2をチップ基板1に貼り付けるだけの簡素な構成なので、製造を簡便化して生産性を向上させることができるという利点がある。さらに、薄膜部材2は樹脂により形成され疎水性を有するので、スポットティングヘッドにより水溶性のブローブ溶液を凹部3aに供給する際に、供給位置に多少のずれがあっても、疎水性の薄膜部材2に弾かれるようにしてブローブ溶液が所定の凹部3aに供給されるようになるという利点がある。

【0048】なお、上述の実施形態では、DNAチップを製造する際、図3に示すように、複数の薄膜部材2を連続的に形成した長尺の薄膜部材2'を巻回してロール

を構成し、このロール2'から所定量の薄膜部材を送り出して一枚のチップ基板1に対応する寸法に裁断するようにしているが、例えば、図5に示すように、複数の薄膜部材2を連続的に形成した薄膜部材2''を台紙5に貼り付けた後、薄膜部材2''にだけ図中に二点鎖線で示すように一枚のチップ基板1に対応する寸法に切り込みを入れておき、台紙5から薄膜部材2を剥がしてチップ基板1に貼り付けるようにしても良い。

【0049】また、上述の実施形態では生体試料としてDNAを用いた例を説明したが、生体試料はDNA以外10のRNA（リボヌクレオチド）やPNA（ペプチドクレオチド）のようなオリゴヌクレオチドであっても良いし、複数のアミノ酸より形成されるペプチド（タンパク質も含む）であってもよい。RNAやPNAを用いたチップの用途としては上述の実施形態と同様に遺伝子解析ひいては遺伝子病の診断であり、ペプチドを用いたチップの用途としては、抗原-抗体反応や酵素反応を利用した各種の病気の診断が考えられる。

（B）第2実施形態の説明

次に、本発明の第2実施形態としては、薄膜状部材に設けられた開孔部が流路として形成されているものであり、具体的には、化学合成用チップ（マイクロリアクタチップ）、この化学合成用チップを用いた化学合成試験（化学反応試験方法）及びこの化学合成用チップに用いられる薄膜部材である。この化学合成用チップは、例えば、通常の有機及び無機合成反応、及び、オリゴヌクレオチドやペプチド等を用いた生化学反応等に用いられる。以下、これらについて説明する。図6及び図7は本実施形態の化学合成用チップの一例について示す図である。

【0050】本発明の化学合成用チップ（以下、単にチップともいう）は、図6（A）、（B）に示すように、（図6（B）は幅方向よりも厚み方向に大きく拡大して示す拡大図である）、チップ基板11と、このチップ基板11に積載され貼り付けられる薄膜部材12とをそなえて構成されている。そして、薄膜部材12には開孔部13が形成されており、この開孔部13は、チップ基板11の表面と協働して化学合成用の試料を流通させる流路14を形成するようになっている。

【0051】流路14は、例えば図6（A）に示すように、複数（ここでは3つ）の分岐路14a～14cと、これらの分岐路14a～14cが集合して形成される合流路14dとをそなえて構成されている。このような構成により、各分岐路14a～14cの上流端に設けられた試料注入部14A～14Cから互いに異なる試料が注入されると、これらの試料が、合流路14dで合流して合成反応を起こし、所定の合成反応物が、合流路14dの下流端に設けられた試料採取部14Dから採取できるようになっている。化学合成用の試料としては、目的に応じて適宜選択されるもので、通常の有機合成反応で用

いられる試薬の他、上述の第1実施形態で記載したDNA、RNA、PNA等のオリゴヌクレオチドやペプチド（タンパク質も含む）のような生体由来の試料（生体試料）でもよい。

【0052】チップ基板11の平面寸法（幅及び長さ）や厚みは、化学合成反応に応じて適宜決定され、例えば所定の合成反応を得るのに比較的長い時間を要するのであれば、合成反応が行なわれる合流路14dの流路長を比較的大きく設定して試料が合流路14dの下流端の試料採取部14Dに流れ着くまでの時間を長く取れるように構成することも考えられ、これにより、合成反応が開始してから完了するまでの経過を、合流路14dに沿って観察することも可能となる。

【0053】チップ基板11は、ここでは、加工容易な材質により形成されるとともに、合成反応に影響を及ぼさないように、薄膜部材12が貼り付けられる側（試料と接する側）の表面には、流路14を流れる試料に対して化学反応しない材質（例えばステンレス鋼のような耐腐食金属、ガラス、テフロン（登録商標）、チタン、セラミックス等）からなる表面層11aが形成されている。勿論、試料に対して化学反応しないこのような材質により、チップ基板11自体を構成するのであれば表面層11aを設ける必要はない。

【0054】この他、チップ基板11の材質としては、例えば、試料がDNA溶液であれば、第1実施形態のDNAチップ（図1参照）のチップ基板1の材質として例示した上記の樹脂材を使用することができ、その成形も上記のチップ基板1の成形方法をそのまま使用することができる。また、薄膜部材12は、チップ基板11と同じ平面寸法に設定され、厚みT2は、3μm～500μmの範囲で設定される。また、薄膜部材12は、片面に接着剤が塗工されてこの面でチップ基板11に貼り付けられ、このような接着剤としては、試料に対して耐性を有するものが適宜選択される。また、薄膜部材12の材質として、チップ基板11と同様に試料に対して化学反応しない材質が適宜選択される。

【0055】開孔部13は、レーザ加工又は打ち抜き加工により薄膜部材12に貫設されて形成される。開孔部13（流路14）の幅（流路幅）は、設計条件に応じて適宜設定されるものであるが、通常は3μm～3000μmの範囲で設定され、好ましくは、10μm～1000μm、さらに好ましくは10～500μmであり、流路幅を適切なものとするにより、試料の流通を確保するとともに微量な試料での合成反応が可能となる。

【0056】また、開孔部13（流路14）の流路長や道筋は、合成反応に応じて適宜に決定されるものであり、図6（A）、（B）に示すものに限定されるものではない。このような化学合成用のチップの製造工程は、チップ基板11及び薄膜部材12の材質に応じて決定されるものであるが、例えば、チップ基板11及び薄膜部

材12を、上述した第1実施形態のDNAチップと同様に樹脂で形成する場合には、図2に示すDNAチップの工程に対して、ステップA80のスポットティングが無くなったものと略同じものとなる。

【0057】但し、流路の途中、又は、最終部に検出用の試薬（例えば、プローブDNA等）を固定化しておくことで、この固定化された試料と流路を流れる試料との反応生成物の検出をすることも可能であり、この場合には、第1実施形態と同様にステップA80のスポットティング工程が行なわれる。本発明の第2実施形態としての化学合成用チップは上述したように構成されており、以下の手法（本発明の第2実施形態としての化学反応試験方法）により、図7のフローチャートに示すように反応試験が行なわれる。つまり、まず、互いに異なる所定の試料が、試料注入部14A～14Cに注入される（ステップC10）。そして、これらの試料は、分岐路14a～14cから合流路14dへ流れて混合され合成反応を起こす（ステップC20）。そして、試料はやがて合流路14dの下流端の試料採取部14Dに流れ、試料採取部14Dから合成反応物が採取され、分析される（ステップC30）。

【0058】したがって、本化学合成用チップ及び本化学合成用チップを用いた化学反応試験では、以下のような利点が得られる。つまり、本化学合成用チップは、開孔部13が設けられた薄膜部材12をチップ基板11に貼り付けるだけの簡素な構成なので、製造を簡便化して生産性を向上させることができるという利点がある。

【0059】また、従来のように、試料を流通させる流路としてチップ基板にエッチング等により溝を形成する場合、溝加工では、溝底部のエッジ形状にばらつきが生じてしまう虞がある。これに対し、本化学合成用チップは、開孔部13が設けられた薄膜部材12をチップ基板11に貼り付けることにより、開孔部13とチップ基板11の表面とにより流路14を形成し、かかる開孔部13は薄膜部材12に貫設されて形成されるので、溝加工に比べ加工が容易であるとともに加工形状を安定させることができるという利点がある。また、これにより、チップの製造誤差による合成試験への影響を極力排除できるという利点もある。

（C）その他

なお、本発明のマイクロリアクタは、上述の各実施形態のものに限定されず、発明の趣旨を逸脱しない範囲で種々変形することが可能である。

【0060】例えば、薄膜部材にそれぞれ独立した複数の開孔部を設け、この薄膜部材をチップ基板に積層することにより、これらの開孔部とチップ基板表面とで複数の独立した反応チャンバを形成するようにしても良い。この場合、一つのマイクロリアクタ内で複数の化学反応を同時に並列的に行なうことにより、全体を同一条件で処理し検査して最適条件を容易に決定することができ

る。

【0061】また、上述の実施形態では、薄膜部材に接着剤を塗布して、チップ基板に貼り付けるようにしているが、薄膜部材をチップ基板に安定して積層できる構成であれば良く、例えば、接着剤の代わりに、薄膜部とチップ基板との間に両面粘着テープを介装するように構成しても良い。又は、薄膜部材とチップ基板とが同じ材質であれば、これらを溶着させるようにしても良く、溶着方法としては、熱融着、フープ成型、又は、溶剤によるものでよい。溶剤を用いる場合は、溶剤は比較的早期に揮発してしまうので、薄膜部材及び／又はチップ基板への溶剤の塗布は、薄膜部材とチップ基板とを溶着する直前に行なわなければならない。

【0062】

【発明の効果】以上詳述したように、請求項1記載の本発明のマイクロリアクタチップによれば、開孔部が設けられた薄膜部材をチップ基板に積層するだけの簡素な構成により、開孔部とチップ基板とにより協働して試料を収容できるので、製造作業を簡便化して生産性を向上させることができるという利点がある。

【0063】また、開孔部は薄膜部材を貫設して設けらるが、このように貫設により開孔部を形成することで加工が安定したものとなって、製造精度を向上させることができるという利点がある。薄膜部材の厚さ、即ち、薄膜部材の開孔部とチップ基板とにより形成される試料の収容部の深さを3 μ m～500 μ mの範囲に設定することにより、試料を安定して収容でき、且つ、収容される試料の量を必要最小限にできるという利点がある（請求項2）。

【0064】薄膜部材に設けられた開孔部を、独立した複数の微小孔で構成することにより、試料が、薄膜部材に設けられた微小孔内に安定して収容されるので、マイクロリアクタチップ上に配置される試料の混合を防止してスポット密度を向上させることができ、化学反応試験を効率的に行なうことができるようになるという利点がある（請求項3）。

【0065】微小孔の開孔寸法を10 μ m～500 μ mの範囲で設定することにより十分なスポット密度が確保され、1枚のマイクロリアクタチップにより扱える試料点数を増加して化学反応試験を効率的に行なうことができるという利点がある（請求項4）。開孔部を、試料を流通させるための流路として形成することにより、少量の試料を流通させるだけで所定の化学反応をおこなうことができるという利点がある（請求項5）。

【0066】流路の幅寸法を10 μ m～1000 μ mの範囲に設定することにより、試料の流通を確保するとともに微量な試料での合成反応を行なえるという利点がある（請求項6）。試料を、オリゴヌクレオチド又はペプチドとすることにより、遺伝子解析や病気の診断を行なうことができるという利点がある（請求項7）。

(9)

特開2002-27984

15

【0067】請求項8記載の本発明の化学反応試験方法によれば、請求項1～7の何れかの項に記載のマイクロリアクタチップを用いて化学反応試験を行なうので、少量の試料で効率的に試験を行なうことができるという利点がある。請求項9記載の本発明のマイクロリアクタチップ用薄膜部材によれば、試料を収容するのに使用される開孔部が貫設され、分割されてチップ基板に積層されるマイクロリアクタチップを構成するので、マイクロリアクタチップの製造作業を簡便化して生産性を向上させることができるようになるという利点がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の第1実施形態としてのDNAチップの構成を示す図であり、(A)はその模式的な平面図、(B)は(A)のX-X断面を拡大して示す模式図である。

【図2】本発明の第1実施形態としてのDNAチップの模式的な製造工程図である。

【図3】本発明の第1実施形態としてのDNAチップにかかる薄膜部材のロールの構成を示す模式的な斜視図である。

【図4】本発明の第1実施形態としてのDNAチップを使用した塩基配列の解析方法を説明するためのフローチャートである。

【図5】本発明の第1実施形態としてのDNAチップの製造方法の変形例を説明するための図であって、(A)*

16

*はその薄膜部材の模式的な平面図、(B)はその薄膜部材の模式的な側面図である。

【図6】本発明の第2実施形態としての化学合成用チップの構成を示す図であり、(A)は模式的な平面図、

(B)は(A)のX1-X1断面を拡大して示す模式図である。

【図7】本発明の第2実施形態としての化学合成用チップを使用した反応試験方法を説明するためのフローチャートである。

10 【符号の説明】

1, 11 チップ基板

1a, 11a コーティング膜

2, 12 薄膜部材

2' 薄膜部材のロール

2'' 薄膜部材

3, 13 開孔部

3a 凹部

4 フィルム

5 台紙

20 14 流路

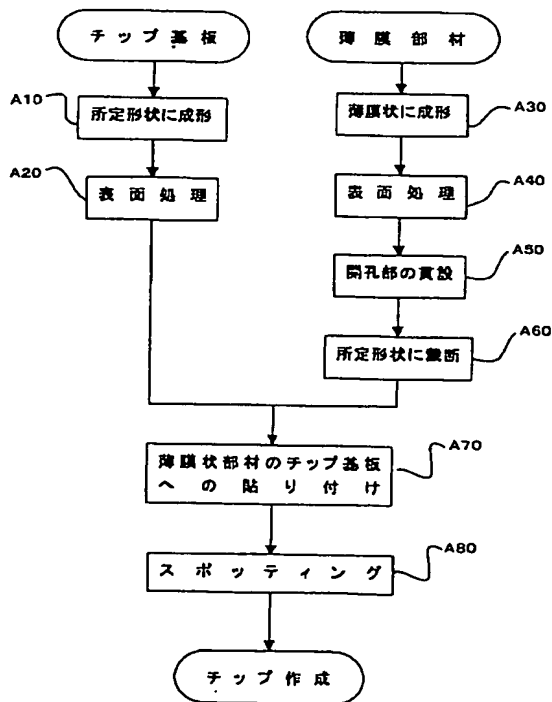
14A～14C 試料注入部

14D 試料採取部

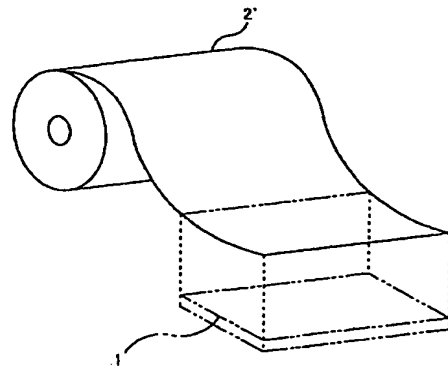
14a～14c 分岐路

14d 合流路

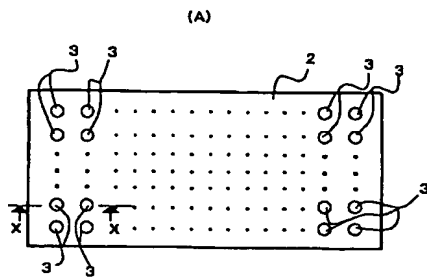
【図2】



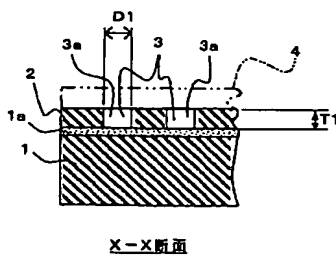
【図3】



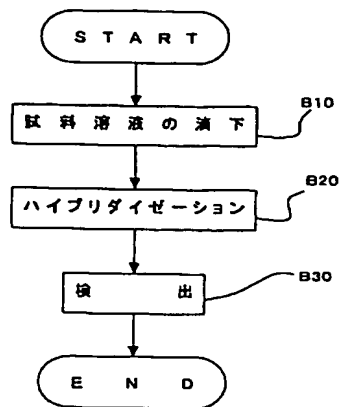
【図1】



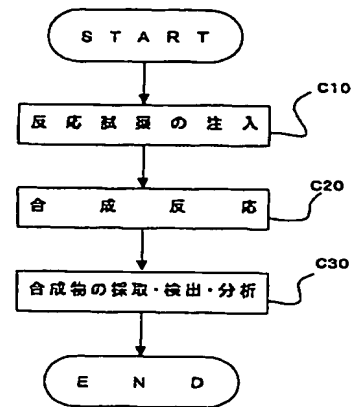
(B)



【図4】

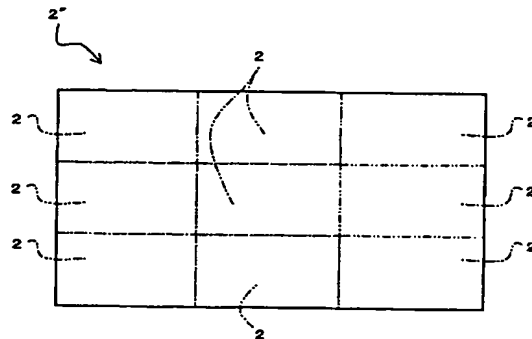


【図7】

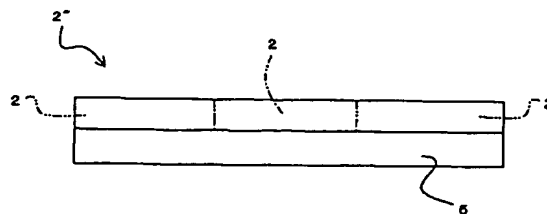


【図5】

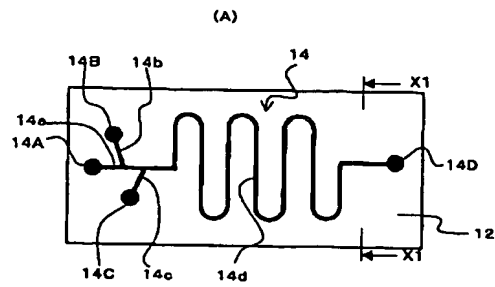
(A)



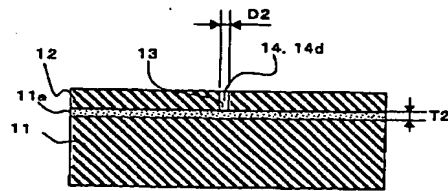
(B)



【図6】



(B)



X1-X断面

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード (参考)
G 0 1 N 33/566		G 0 1 N 35/02	F
35/02		37/00	1 0 2
37/00	1 0 2	C 1 2 N 15/00	F

F ターム (参考) 2G042 AA01 BD19 HA02
 2G058 CC02 CC08 EA01 EA11 FB01
 GA02
 4B024 AA11 CA01 CA04 CA11 HA14
 4B029 AA07 AA21 AA23 BB15 BB20
 CC03 CC09 CC10 FA12
 4B063 QA01 QQ42 QQ52 QR32 QR55
 QS25 QS34